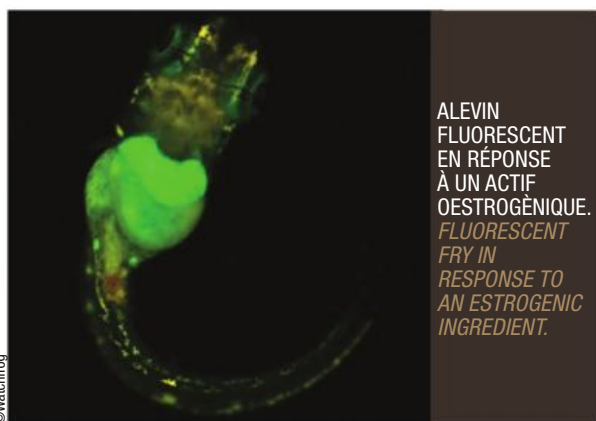


Perturbateurs endocriniens :

Sujet défrayant régulièrement la chronique, les perturbateurs du système endocrinien cristallisent l'attention des médias et du grand public, obligeant les autorités à se pencher sur le sujet. Le point sur les outils mis à disposition de l'industrie cosmétique pour évaluer le risque de perturbations endocriniennes de leur matière première, produit fini ou emballage.



ALEVIN
FLUORESCENT
EN RÉPONSE
À UN ACTIF
OESTROGÉNIQUE.
FLUORESCENT
FRY IN
RESPONSE TO
AN ESTROGENIC
INGREDIENT.

©Watchdog

Très active sur le sujet, la France a lancé une stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens (PE) avec un plan d'action ambitieux : renforcer les moyens des agences sanitaires, former les professionnels de santé, informer les consommateurs des risques potentiels et lancer une plateforme publique/privée pour pré-valider des méthodes de détection des perturbateurs endocriniens. Prise en charge par le Medef et l'Ineris (Institut

National de l'Environnement Industriel et des Risques), celle-ci a pour objectif de développer l'éventail des outils à disposition des industriels tout en privilégiant des méthodes alternatives à l'expérimentation animale. « *L'idée est de transposer au niveau européen cette stratégie, en prenant en compte l'ensemble des expositions possibles : jouets, cosmétiques, emballages alimentaires...* », explique Michel Franz, adjoint au chef du Bureau de Produits Chimiques, DGPR, au Ministère de la Transition écologique et solidaire. Objectif : une application immédiate des nouveaux critères des substances en cours de réévaluation au niveau communautaire est en cours de discussion. La France a d'ailleurs mobilisé 50 M€ en faveur de la recherche sur les effets des PE.

► Évaluation de la sécurité des produits cosmétiques

Adopter une bonne approche autour des perturbateurs endocriniens, c'est

Endocrine disruptors: what is

Regularly hitting the headlines, endocrine-disrupting chemicals often dominate the news, and draw the attention of both the media and the public at large, forcing the authorities to look into the matter. Update on the tools available to the cosmetics industry to assess the risk of endocrine disruption for their ingredients, finished products or packagings.



ESSAIS IN VITRO
SUR TÉTARDS.
IN VITRO ASSAY
WITH TADPOLES.

©Watchdog

Very active on the subject, France has implemented a national strategy on endocrine disruptors (EDs) with an ambitious action plan: strengthen the resources of health agencies, train health professionals, inform consumers of potential risks and launch a public/private platform to pre-validate detection methods for endocrine disruptors. Driven by the Medef and the Ineris (French National Institute of Industrial Environment and Risks), this platform aims to develop the

range of tools available to players in the industry while giving preference to alternative methods to animal testing. "The idea is to transpose this strategy at the European level, taking into account all possible exposures: toys, cosmetics, food packagings..." explained Michel Franz, Deputy Head of the Bureau of Chemical Products, DGPR, at the French Ministry of Ecological and Solidarity Transition. Goal: an immediate application of the new criteria for substances undergoing reassessment at the community level is under discussion. France has earmarked €50m. into research on the effects of EDs.

► Safety assessment of cosmetics

Adopting the right approach on endocrine disruptors is first to understand their definition as recalled at the last Perfumes and Cosmetics Congress

quelle approche adopter ?

d'abord comprendre leur définition comme le rappelait lors du dernier congrès Parfums et Cosmétiques de Chartres, Emmanuel Lemazurier, chargé de mission chez Ineris. « *Le système endocrinien est un système adaptatif à l'environnement et aux hormones, qui permet l'homéostasie. Dès que l'on en sort, des effets néfastes peuvent être observés* ». Car c'est bien l'effet indésirable qui caractérise la perturbation endocrinienne. « *Pour comprendre la mécanistique à l'origine de l'effet néfaste, les autorités législatives ont mis en place un système AOP (Adverse Outcome Pathway), une approche qui lie l'exposition à une réponse d'une population voire d'un individu. Mais elle nécessite l'utilisation d'outils à haut débit génomiques et/ou mathématiques pour extrapoler les résultats in vitro/in vivo* », complète l'expert d'Ineris. Pour mesurer le caractère perturbateur du système endocrinien, l'OCDE a publié une stratégie de tests à mener sur une substance au

travers du Guide 150. Cinq niveaux d'investigation sont définis afin d'adapter la stratégie en fonction du produit à évaluer. En cosmétique, il existe des tests *in vitro* et *in vivo* sur des stades précoces d'œufs ou de larves d'amphibiens acceptables dans une approche tests sans animaux (Cf. encadré p.36). Un autre modèle sur base placentaire imaginé par le Pr. Patrice Rat (CNRS) est en cours de développement et devrait être validé dans les années à venir. L'Ineris alerte cependant sur un risque de raccourci rapide : un seul test ne suffit pas à conclure sur l'absence ou la présence d'une perturbation endocrinienne. La question de la dose/réponse et de l'exposition de populations non cibles est également à prendre en compte. La question des PE réclame de sortir de la toxicologie du monde du travail et de la pharmacie pour la confronter au monde réel, soulignent les autorités. ■

Doria Maïz

the approach to adopt?

in Chartres, Emmanuel Lemazurier, Key Account Manager at Ineris. "The endocrine system is an adaptive system to the environment and hormones, which enables homeostasis. When this system is disrupted, adverse effects are observed." Because it is indeed the adverse effect that characterizes endocrine disruption. "To understand the mechanistic behind the adverse effect, legislative authorities have launched an AOP system (Adverse Outcome Pathway), which is an approach linking exposure to a response of a population or even of an individual. But it requires using high-throughput genomic and/or mathematical tools to extrapolate in vitro/in vivo, results," added the Ineris expert. To measure the disruptive nature of the endocrine system, the OECD published standardised test guidelines to evaluate a substance through its Guidance Document 150.

Five levels of investigation are defined in order to adapt the strategy according to the product to be evaluated. In cosmetics, there are in vitro and in vivo assays on the early stages of eggs or larval amphibians acceptable in a test approach with no animals (Cf. box p. 36). Another model on a placental base imagined by Prof. Patrice Rat (CNRS) is under development and should be validated in the coming years. Ineris however wishes to warn on the risks of being tempted to make easy shortcuts: a single test is not enough to conclude on the absence or presence of endocrine disruption. Should also be considered, the issues on the dose/response and on the exposure of non-target populations. The issue on EDs must not remain confined to the toxicology of the occupational and pharmaceutical sphere and be also confronted to the real world, underlined the authorities. ■

ÉVALUATION DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS : TROIS STRATÉGIES DÉVELOPPÉES PAR LE LABORATOIRE WATCHFROG.

EVALUATION OF ENDOCRINE DISRUPTORS: THREE STRATEGIES DEVELOPED BY THE LABORATORY WATCHFROG.

| | |
|-------------------------------------|--|
| AXE / AXIS: | ŒSTROGÉNIQUE / ESTROGENIC |
| NOM DU TEST TEST NAME: | REACTIV |
| ORGANISME UTILISÉ ORGANISM USED: | Test réalisé sur des larves précoces (J0 à J2) d' <i>Oryzias latipes</i> , comprenant le promoteur du gène de la choriogénine, sensible aux œstrogènes, couplé au gène rapporteur de fluorescence GFP. / Test conducted on early larvae (D0 to D2) of <i>Oryzias latipes</i> , comprising the estrogen sensitive, gene promoter of choriogenin, coupled to the GFP fluorescence reporter gene. |
| RÉSULTAT RESULT: | Résultats exprimés sur une échelle de perturbation et en équivalent hormonal, Activité œstrogène mesurée par rapport aux critères des guidelines OCDE 229 et 230 (reproduction poisson). / Results expressed on a disruption scale and hormone equivalent. Estrogen activity measured against OECD guidelines criteria 229 and 230 (fish reproduction). |
| AXE / AXIS: | THYROÏDIEN / THYROID |
| NOM DU TEST TEST NAME: | XETA |
| ORGANISME UTILISÉ ORGANISM USED: | Test réalisé sur des larves précoces (J0 à J3) de <i>Xenopus laevis</i> . Têtards portant le promoteur du gène TH/bZIP, marqueur de la métamorphose chez l'amphibien, couplé au gène rapporteur de fluorescence GFP. / Test conducted on early larvae (D0 to D3) of <i>Xenopus laevis</i> . Tadpoles carrying the TH/bZIP gene promoter, a metamorphosis marker in amphibians, coupled to the GFP fluorescence reporter gene. |
| RÉSULTAT RESULT: | Résultats exprimés sur une échelle de perturbation et en équivalent hormonal. Activité thyroïdienne mesurée par rapport aux critères de la guideline OCDE 231 pour le test de perturbation thyroïdienne AMA (Amphibian Metamorphosis Assay). / Results expressed on a disruption scale and hormone equivalent. Thyroid activity measured against OECD guidelines criteria 231 for the AMA thyroid disruption test (Amphibian Metamorphosis Assay). |
| AXE / AXIS: | ANDROGÉNIQUE / ANDROGENIC |
| NOM DU TEST TEST NAME: | RADAR |
| ORGANISME UTILISÉ ORGANISM USED: | Test réalisé sur des larves précoces (J0 à J4) d' <i>Oryzias latipes</i> , comprenant le promoteur du gène de la spiggin, sensible aux androgènes, couplé au gène rapporteur de fluorescence GFP. / Test conducted on early larvae (D0 to D4) of <i>Oryzias latipes</i> , comprising the androgen sensitive, gene promoter of spiggin, coupled to the GFP fluorescence reporter gene. |
| RÉSULTAT RESULT: | Résultats exprimés sur une échelle de perturbation et en équivalent hormonal. Activité androgène mesurée par rapport aux critères, de l'OCDE dans l'AFSS 128 (reproduction poisson). / Results expressed on a disruption scale and hormone equivalent. Androgenic activity measured against OECD criteria, from the AFSS 128 (fish reproduction). |

Trois questions à... Three questions for...



Dr. Grégory LEMKINE
WATCHFROG
PDG et co-fondateur
CEO and co-founder



Sandrine LE GALL
WATCHFROG
Directrice des opérations
& du développement
Operations & Development
Manager

Comment est né le Laboratoire Watchfrog ? What was the background for the creation of the Laboratoire Watchfrog ?

GL : Au début des années 2000, en tant qu'experts du MNHN (Muséum National d'Histoire Naturelle), nous avons été sollicités pour mettre au point des tests *in vitro* d'évaluation des perturbateurs endocriniens pour l'industrie cosmétique. En 2005, après des années de recherche pour établir des protocoles fiables, nous avons lancé la société. Aujourd'hui, nous sommes le seul laboratoire privé européen à proposer des alternatives aux tests sur animaux de laboratoire, validés par l'OCDE, éthiques, simples et rapides d'exécution. De nombreux tests cellulaires existent. Mais la difficulté réside à élaborer des méthodologies sur un organisme entier et intact, pour être le plus représentatif possible de la perturbation endocrinienne chez un vertébré. Désormais, nos tests sont commercialisés par des prestataires de services à l'instar d'IDEA Tests, par exemple.

GL : *In the early 2000s, as experts to the French MNHN (National Museum of Natural History), we were asked to develop for the cosmetic industry, in vitro tests for the evaluation of endocrine disruptors. In 2005, after years of*

of reliable protocols, we started the Company. We are today the only European private laboratory to offer alternatives to lab tests on animals, validated by the OECD and which are ethical, simple and fast to implement. Many cellular tests exist. But the difficulty lies in developing methodologies on an entire intact organism, to be as representative as possible of endocrine disruption in a vertebrate. Now, our tests are marketed by service providers such as IDEA Tests.

Sur quels principes reposent vos tests ? On what principles are your tests based ?

GL : Nous travaillons sur les trois principales perturbations endocriniennes : oestrogénique, androgénique et thyroïdienne. Pour cela, nous faisons appel à des organismes embryonnaires, dont les mécanismes hormonaux ont été conservés durant l'évolution des espèces, donc très proches de ceux présents chez l'Homme. Par transgénèse, toute perturbation endocrinienne est traduite par l'expression d'une protéine fluorescente, avec une réponse qu'il est possible de quantifier grâce à un système rapporteur (Cf. Tableau p.35). Chaque promoteur étant spécifique de la voie de signalisation d'un effet néfaste, selon l'approche AOP (voir plus haut, p.35). Les résultats sont exprimés selon un cursus de 0 à 100 % (0 % : aucun effet,

100 % : effet néfaste) selon les seuils d'interprétations physiologiques définis par les critères de l'OCDE.

GL : *We are working on the three main endocrine disruptions: estrogenic, androgenic and thyroid. For this, we use embryonic organisms, the hormonal mechanisms of which were preserved during the evolution of species, so therefore very close to those present in humans. By means of transgenesis, any endocrine disruption results in the expression of a fluorescent protein, with a response that can be quantified thanks to a reporter system (Cf. Table p. 35). Each promoter is specific to the signalling pathway of an adverse effect, according to the AOP approach (Cf. above, p. 35). Results are expressed according to a cursus ranging from 0 to 100% (0%: no effect, 100%: adverse effect) according to the thresholds of physiological interpretations defined by the OECD.*

Comment accompagnez-vous les industriels cosmétiques dans l'évaluation des perturbateurs endocriniens ? How do you support cosmetic companies in the evaluation of endocrine disruptors ?

SLG : Face à ce nouveau champ d'investigation, la plupart des industriels se sentent perdus sur les

matières premières ou ingrédients à tester vis-à-vis des perturbateurs endocriniens. Nous les aidons à faire une pré-sélection intelligente des substances à tester. Et une fois le résultat obtenu, à les analyser avec l'aide de toxicologues. Nous pouvons aussi les accompagner avec nos partenaires pour définir un plan d'action industriel (remplacement de l'ingrédient, du packaging...) si besoin et les conseiller sur la communication à avoir, notamment en les incitant à la plus grande prudence et privilégier une communication scientifique, car le sujet est sensible. L'erreur serait de ne pas anticiper l'évaluation des perturbateurs endocriniens.

SLG : *With this new field of investigation, most manufacturers feel lost when it comes to testing their raw materials or ingredients for endocrine disruptors. We help them make an intelligent pre-screening of substances to test. And once the result is obtained, to analyse them with the help of toxicologists. We can also accompany them with our partners to set up an industrial action plan (replacement of the ingredient, of the packaging...) if need be, and give them advise on their communication, in particular by encouraging them to act with the utmost caution and to opt for scientific communication, because it is indeed a sensitive subject. The mistake would be to not anticipate the evaluation of endocrine disruptors. ■*